

Biofilms en cuevas turísticas: la Cueva de Nerja y la Cueva del Tesoro

Y. del Rosal Padial ⁽¹⁾, V. Jurado Lobo ⁽²⁾, M. Hernández Mariné ⁽³⁾, M. Roldán Molina ⁽⁴⁾ y C. Sáiz Jiménez ⁽²⁾

⁽¹⁾ Instituto de Investigación, Fundación Cueva de Nerja. C/ Carretera de Maro, s/n, 29787 Nerja, Málaga, yolanda@cuevadenerja.es

⁽²⁾ Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. IRNAS-CSIC. Avda. Reina Mercedes, 10, 41012, Sevilla, vjurado@irnase.csic.es; saiz@irnase.csic.es

⁽³⁾ Biología, Sanidad y Medio Ambiente. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Av. de Joan XXIII, 27-31, 08028, Barcelona marionahernandez@ub.edu

⁽⁴⁾ Servicio de Microscopía. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona. Servicio de Microscopía, Edificio C, 08193, Bellaterra, Barcelona, monica.roldan@uab.es

RESUMEN

La geomorfología del medio subterráneo depende de su historia geológica, y de los fenómenos que lo modelan, como la erosión y otros agentes externos. Además, sobre los sedimentos, las paredes o los espeleotemas de cuevas se desarrollan poblaciones de microorganismos que modifican la superficie mineral. Así, la colonización de este medio estará en función de las condiciones ambientales, del grupo de microorganismos en cuestión y de la biorreceptividad de los sustratos. Las cuevas se consideran espacios especializados que se caracterizan por una temperatura uniforme, elevada humedad y escasos recursos nutricionales y energéticos. Las cuevas turísticas presentan mayor disponibilidad de energía, generada por la luz artificial y la entrada de materia orgánica, y favorecen la presencia de un mayor número de organismos fotosintéticos y heterótrofos. El desarrollo de microorganismos sobre las paredes y los espeleotemas de las cuevas pueden producir procesos de biodeterioro, es decir, cambios indeseables en el sustrato. En este trabajo se presenta la información obtenida sobre la microbiota que coloniza espeleotemas iluminados de dos cuevas turísticas, la Cueva de Nerja y la Cueva del Tesoro (Málaga), mediante el empleo combinado de la microscopía y del análisis molecular. Los resultados ponen de manifiesto que los microorganismos se organizan en comunidades estructurales complejas denominadas biofilms. El empleo de la microscopía ha permitido conocer la composición del sustrato y su relación con el biofilm, así como observar procesos de biodeterioro relacionados con cambios físicos y químicos del sustrato tales como decoloración, pérdida de consistencia, ruptura y disolución. En relación con la composición de los biofilms, se ha observado una biodiversidad dominada por cianobacterias y microalgas, junto con actinobacterias, proteobacterias, arqueas, hongos e incluso protozoos y pequeños artrópodos. El análisis molecular revela la presencia de nuevas especies de microorganismos en ambas cuevas. El conocimiento de estas comunidades, así como sus mecanismos de biodeterioro permite el diseño de medidas preventivas y correctoras destinadas al control y a una adecuada conservación del patrimonio natural y cultural de ambas cuevas.

Palabras clave: biodeterioro, biofilms, conservación, cuevas, microorganismos.

Biofilms in show caves : Nerja Cave and Tesoro Cave

ABSTRACT

The geomorphology of the subterranean environment depends on its geological history, and phenomena such as erosion and other external agents. Moreover, in the caves the development of microorganisms can change the surface of sediments, walls and speleothems. Therefore, the colonization of a cave will depend on the environmental conditions, the type of microorganisms involved and the substrata bioreceptivity. Caves are considered specialized areas characterized by a uniform temperature, high humidity and low nutritional and energy resources. Visited caves have more available energy, produced by artificial lighting and the input of organic matter, and these conditions allow the growth of photosynthetic and heterotrophic organisms. The development of microorganisms on the cave walls and speleothems may produce biodeterioration, i.e., undesirable changes in the substratum. This work provides information on the microbiota that colonizes illuminated speleothems in two tourist caves, Nerja and Tesoro (Málaga), through the combined use of optical and electron microscopy, together with molecular analysis. The results showed that, in both caves, microorganisms are organized into complex structural communities called biofilms. The microscopic approach provides data on the substratum composition and its relationship with the biofilm. Biodeterioration processes related to physical and chemical changes of the substratum such as discoloration, loss of consistency, breaking and dissolution, were also observed. The biofilms were dominated by cyanobacteria and microalgae together with actinobacteria, proteobacteria, archaea, protozoa, fungi and even small arthropods. Moreover, molecular analysis revealed the presence of new species of microorganisms in both caves. Knowledge about these communities and their mechanisms of biodeterioration allows the design of preventive and corrective actions, according with a proper conservation of natural and cultural heritage of both caves.

Key words: *biodeterioration, biofilms, conservation, caves, microorganisms.*

Los microorganismos y el medio subterráneo

Los microorganismos forman el conjunto de seres vivos con mayor cantidad de biomasa y también el más extendido por el planeta. Gracias a su gran capacidad de adaptación a las condiciones ambientales han colonizado la práctica totalidad de los ecosistemas, incluidos los extremos. Las cuevas son ambientes muy específicos, con escasos recursos nutricionales y energéticos por lo que resultan hábitats hostiles para muchos grupos de microorganismos (Barton y Northup, 2007). Un amplio espectro de microorganismos ha sido identificado en el interior de las cuevas: bacterias, arqueas, hongos, levaduras y algas, que constituyen los principales organismos que forman los biofilms aerobios de cavidades (Jurado et al., 2010a). Las bacterias son los microorganismos más representativos del ambiente subterráneo, principalmente las actinobacterias de los géneros *Agromyces*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Nocardioides* y *Streptomyces* (Jurado et al., 2010a). Aunque menos numerosos, también se han realizado trabajos sobre arqueas en cavidades que identificaron filotipos diferentes de *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota* (Chelius y Moore, 2004). Los hongos más comunes encontrados en cuevas son de morfología filamentosa (Northup y Lavoie, 2001), como los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* o *Cladosporium*. En la cueva de Lascaux (Francia) el desarrollo masivo del hongo *Fusarium solani* dio lugar a una serie de crisis biológicas en la cavidad que han provocado un cambio irreversible en las condiciones ecológicas de la cueva así como el cese de la actividad turística (Bastian et al., 2010). Los microorganismos fotosintéticos de las cuevas incluyen cianobacterias, algas, briófitos, helechos y líquenes que se localizan en la zona más externa, con disponibilidad de luz natural, o en el entorno de focos de luz eléctrica. En las zonas más profundas las cianobacterias suelen ser el grupo dominante y presentar adaptaciones para soportar escasa iluminación y humedad. Estas pátinas reciben el nombre de *flora de las lámparas* o *lampenflora* y forma recubrimientos en sedimentos, paredes y espeleotemas (Lefèvre 1974; Roldán et al., 2004; Roldán y Hernández Mariné, 2009; Albertano, 2012; Hauer et al., 2015, entre otros). Finalmente, los virus son endoparásitos estrictos que dependen fisiológicamente

de una célula viva y que han sido descritos asociados a microorganismos fotosintéticos en la Cueva del Tesoro (Jurado *et al.*, 2014).

Casi todas las especies de microorganismos disponen de mecanismos mediante los cuales pueden adherirse a las superficies y a otros microorganismos (Hernández-Mariné y Roldán, 2005) y formar comunidades estructuradas, denominadas biofilms o biopelículas, que representan la forma habitual de crecimiento bacteriano en la naturaleza. En general, los biofilms que colonizan las cuevas suelen ser poco diversos, con una estructura sencilla y muy sensibles a cambios ambientales (Chelius *et al.*, 2009). Las interacciones entre los biofilms y el sustrato son complejas y, en ocasiones, conllevan un cambio en las propiedades del sustrato que, cuando es indeseable, se denomina biodeterioro (Hueck, 1965). En las cuevas, los procesos de biodeterioro pueden poner en riesgo la conservación de su patrimonio natural y/o cultural. La literatura científica cuenta con numerosos trabajos que ponen de manifiesto la relación entre la alteración de monumentos pétreos y obras de arte con la presencia de comunidades de microorganismos, tales como bacterias, hongos, líquenes y algas (Warsheid y Braams, 2000). En cuevas, también han sido documentados casos en los que el desarrollo de microorganismos ha representado un factor de riesgo para la conservación de su patrimonio natural y/o cultural como, por ejemplo, los de la cueva francesa de Lascaux (Bastian *et al.*, 2010) o los de las cuevas españolas de Tito Bustillo, (Sáiz-Jiménez, 1999), Castañar de Ibor (Jurado *et al.*, 2010b) o Altamira (Saiz-Jimenez *et al.*, 2011). Prevenir o, en su caso, combatir este tipo de procesos precisa del diseño de actuaciones basadas en el análisis integral de la microbiota que informe sobre su diversidad, estructura, fisiología y relación con el soporte (Albertano y Urzi, 1999).

La Cueva de Nerja y la Cueva del Tesoro

Los datos que se presentan en este trabajo corresponden a observaciones de muestras naturales y de cultivos de biofilms que se desarrollan en espeleotemas iluminados por luz eléctrica. Las muestras de los biofilms fueron obtenidas en la Cueva de Nerja (Nerja) y en la Cueva del Tesoro (Rincón de la Victoria). Ambas cavidades kársticas se localizan en la costa de la provincia de Málaga (España), son turísticas y albergan un importante patrimonio natural y arqueológico. La Cueva de Nerja se desarrolla en mármoles dolomíticos y, a efectos prácticos, se divide en dos zonas: las Galerías Turísticas y las Galerías Altas y Nuevas. Las primeras son las únicas habilitadas para la visita y ocupan un tercio del cavernamiento total. La monitorización ambiental ha permitido determinar, en ambas cuevas, un gradiente de temperatura y humedad relativa del aire que aumenta hacia las zonas más internas. En la zona visitable de la Cueva de Nerja, el valor medio anual de la temperatura, humedad relativa y concentración de dióxido de carbono del aire es de 18,2 °C, 82 % y 667 ppm respectivamente (Liñán *et al.*, 2014). El caudal de goteo en el interior de la cueva es muy bajo, con registros máximos en verano y mínimos en invierno (Liñán *et al.*, 1999). El agua de infiltración es de naturaleza meteórica salvo en la zonas más próxima a la entrada donde el agua de goteo procede del riego de los jardines del exterior. Por otro lado, la Cueva del Tesoro se desarrolla en calizas blancas y alberga volumen subterráneo formado por varias cavidades naturales unidas artificialmente. El valor medio anual de temperatura y humedad relativa del aire es de 19,3 °C y 92,5 %, respectivamente, y la concentración de dióxido de carbono oscila entre 375-20.000 ppm (Hoyos *et al.*, 1996).

El agua de infiltración procede de la lluvia y accede a la cueva a través de las fisuras y torcas durante el invierno (Hoyos *et al.*, 1996), con pocos puntos de goteo activos en la actualidad.

El estudio realizado a los diferentes biofilms permitió conocer aspectos relativos a la biodiversidad de ambas cuevas y su relación con los procesos de biodeterioro. La información obtenida resulta una eficaz herramienta para el diseño de un sistema de gestión acorde con la adecuada conservación del patrimonio cultural y natural de ambas cavidades.

Material y métodos

Las muestras analizadas corresponden a dos zonas en la Cueva de Nerja, una de ellas aparentemente seca y la otra con agua de escorrentía temporal a lo largo del año. En la Cueva del Tesoro, las muestras obtenidas corresponden a una zona con escorrentía constante. En todos los casos, las zonas se encontraban iluminadas por luz artificial durante unas ocho horas al día. En las zonas de muestreo se observaron biofilms que recubrían la superficie y mostraban diferentes tonalidades (azuladas, verdes o pardas). La metodología de estudio abarcó técnicas de análisis filogenético y microscópico cuyos resultados permitieron conocer la diversidad de organismos presentes, sus requerimientos de supervivencia y pautas de colonización así como los procesos de afección al sustrato. La observación directa de material de campo se llevó a cabo mediante un microscopio óptico Axioplan (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) y las imágenes fueron captadas mediante una cámara digital AxioCam MRc5 y procesadas con el software Axioplan LE. La microscopía estereoscópica ofreció información morfológica de la muestra, relacionada con la estructura y textura superficial y permitió determinar el estado de conservación de la superficie o las consecuencias de biodeterioro (pátinas, costras, cavidades, pérdida de material, etc.). El análisis mediante microscopía electrónica de barrido se basó en del Rosal *et al.* (2012) y empleó un equipo Quanta 200, FEI þ EDAX que permitió utilizar las técnicas complementarias de energía dispersiva de rayos x (EDS) y electrones retrodispersados (BSE). Estas técnicas ofrecieron información sobre la composición elemental de la muestra y la naturaleza de sus componentes.

La caracterización de las comunidades microbianas se realizó utilizando técnicas de biología molecular. La extracción de los ácidos nucleicos se realizó siguiendo el método de Griffiths *et al.* (2000). La identificación de cianobacterias, bacterias y arqueas se realizó mediante la secuenciación del gen ARN ribosómico 16S. La identificación de eucariotas se realizó con el gen ARN ribosómico 18S. Los genes se amplificaron mediante PCR empleando las parejas de cebadores Cya 106F (5'-CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTG A-3') y Cya 781R (5'-GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T-3') para cianobacterias (Nübel *et al.*, 1997), 616F (5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3') y 907R para bacterias (Juretschko *et al.*, 1998; Teske *et al.*, 1996), Arch109F (5'-ACK GCT CAG TAA CAC GT-3') y 915R para arqueas (Großkopf *et al.*, 1998) y, EUKA (5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3') y EUKB (5'-TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3') para eucariotas (Diez *et al.*, 2001). A continuación, se construyeron genotecas a partir de los productos de PCR purificados de los genes ARNr 16S y 18S, y empleando el kit comercial TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, California, USA) según las instrucciones del fabricante. Los clones fueron procesados por las empresas Macrogen Europa (Amsterdam, Holanda) y Secugen (Madrid, España). Las secuencias obtenidas se editaron empleando el

programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.5.3 (Hall, 1999) y se analizaron en busca de posibles estructuras quiméricas empleando el paquete de software *mothur* (Schloss *et al.*, 2009). Después de este análisis, todas las secuencias se compararon con las secuencias de las bases de datos del GenBank en el NCBI (National Centre for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), que utiliza el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul, *et al.* 1990).

Resultados y discusión

En la zona seca los biofilms mostraron textura pulverulenta mientras que en las zonas con agua líquida la textura fue gelatinosa. Esta diferencia textural, también se relacionó con dife-

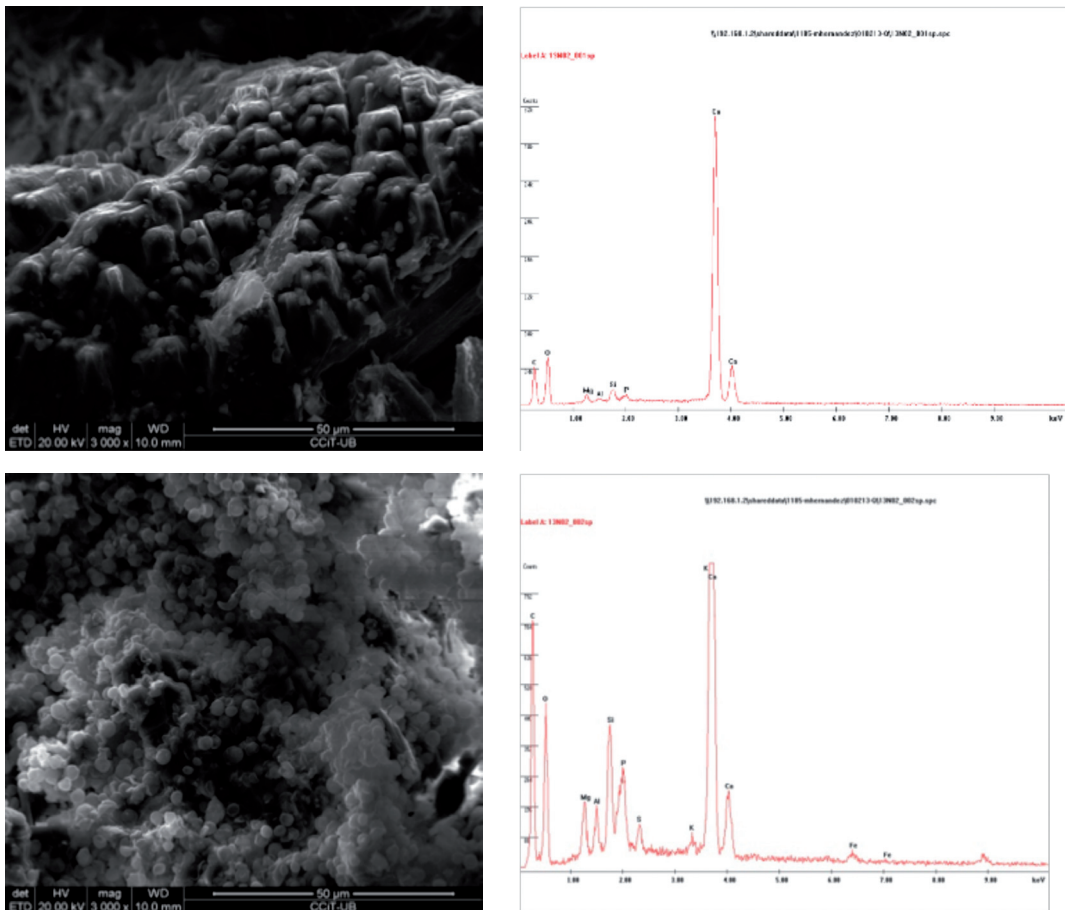


Figura 1. A la izquierda, microfotografías SEM correspondientes a dos puntos de una zona seca de la Cueva de Nerja. A la derecha, espectros EDS de estos puntos. Las imágenes superiores presentan mayor proporción de cristales y menor número de organismos. Por el contrario, las imágenes de abajo muestran mayor proporción de arcilla y mayor crecimiento superficial de organismos

rencias en la biodiversidad de los biofilms, siendo los más sencillos los de textura pulverulenta. En la zona seca fueron identificados dos grupos de organismos fotosintéticos, uno representado por la cianobacteria *Chroococcidiopsis* sp. y, el otro, por la rodofita *Cyanidium* sp., con propiedades de organismo mesófilo (Ciniglia et al., 2004). Ambos organismos se observaron formando biofilms monoespecíficos o combinados, y en este último caso *Cyanidium* sp. ocupando la parte inferior. Esta escasa diversidad de organismos de los biofilms es una característica habitual cuando se desarrollan en condiciones ambientales extremas (Potts, 2001). En las zonas con agua líquida (ocasional o habitual) se identificaron mayoritariamente clorofíceas, representadas por *Jenufa* sp. y *Desmococcus endolithicus* en la Cueva de Nerja y por *Friedmannia* sp. y *Chlorella* spp. en la Cueva del Tesoro. También se identificaron, en menor proporción, cianobacterias con gruesas vainas mucilaginosas como *Aphanothece* sp. y *Gloeothece* spp. así como las filamentosas *Leptolyngbya* spp., *Nostoc punctiforme* o *Phormidium* sp. En esta cueva también se identificó el musgo *Eucladium verticilatum*. Asociados a estos organismos autótrofos también se identificó una abundante comunidad de heterótrofos (bacterias y arqueas) que se nutren de las sustancias sintetizadas y excretadas por los primeros. El análisis molecular confirmó la presencia de estos organismos, además de abundantes especies difíciles de asignar a grupos taxonómicos concretos. Por ejemplo, en ambas cuevas se detectó un gran número de clones (secuencia del gen ARNr 16S) correspondientes a los géneros *Cyanothece*, *Gloeothece* y *Pleurocapsa*. En la Cueva de Nerja ocurrió lo mismo con los géneros *Microcoleus* y *Halothece*, entre otros, sin que pudieran asignarse a una especie determinada. Este hecho puede deberse a que un número elevado de cianobacterias y algas presentes en ambas cuevas pudieran representar nuevas especies aún por describir y cuyas secuencias de ADN no se encuentran disponibles en las bases de datos existentes.

Los espectros de las muestras determinaron una mayor colonización microbiana de los sustratos más porosos y con mayor cantidad de arcilla que podría estar relacionada con una mayor protección y aporte de humedad por parte de estos sustratos hacia los biofilms, así como una mayor presencia de nutrientes, asociados a material arcilloso (Fig. 1). Según Guillitte (1995) la textura del sustrato es una de las principales propiedades que determinan su biorreceptividad, es decir, su potencialidad de ser colonizado por microorganismos. Así, los sustratos porosos, con capacidad de retener agua incrementan el periodo favorable de crecimiento de los microorganismos (Sáiz-Jiménez y Ariño, 1995).

En ambas cavidades, los biofilms mostraron un desarrollo epilítico y casmoendolítico, es decir, sobre la superficie y en las grietas y oquedades del sustrato (Figs. 2a, 2b). El desarrollo casmoendolítico se observó, principalmente, en las zonas más secas, probablemente debido a la presencia de agua de condensación y la necesidad de agua líquida de la mayoría de los organismos identificados para llevar a cabo el proceso de reproducción. La presencia de organismos entre los cristales del sustrato (Fig. 2c) favorece la pérdida de consistencia del mismo e incrementa su porosidad y, con ello, las zonas más propicias para la condensación de agua superficial, que podría inducir procesos de corrosión del sustrato (de Freitas y Schmekal, 2006). Los filamentos de hongos y protonemas de musgos pueden penetrar activamente en el sustrato y, del mismo modo, favorecer la condensación de agua en los huecos generados. En el caso de los musgos, ocasionalmente desarrollan tallo y filidios. En la Cueva del Tesoro se identificó el musgo *Eucladium verticilatum* mientras que en los biofilms de la Cueva de Nerja no se detectó la presencia de musgos. La pérdida de consistencia del sustrato también se

produce cuando los organismos actúan como núcleos de condensación de agua y favorecen la precipitación de cristales en su superficie, contribuyendo a la travertinización del sustrato. La capacidad de precipitar cristales en su superficie ha sido documentada en cianobacterias de los géneros *Scytonema*, *Geitleria* y *Chroococcidiopsis* (Albertano, 2012) así como en algas que habitan en rocas calcáreas (Pouličková y Hašler, 2007). Estos organismos se relacionan con biofilms delgados y con poco mucilago envolvente que integran taxones con filamentos, pues sobreviven mejor en estas condiciones (Lamprinou *et al.*, 2012). En nuestro estudio, se observaron, puntualmente, depósitos de cristales sobre la vaina de cianobacterias en Nerja y de forma más evidente en la Cueva del Tesoro.

Además, los biofilms observados se caracterizaron por presentar una vaina de polisacáridos extracelular (EPS) que los envolvía, de forma individual o comunitaria, y que permitía su adhesión al sustrato y su protección frente a la desecación, gracias a la capacidad de la vaina para almacenar agua (Macedo *et al.*, 2009). La adherencia al sustrato y los cambios de volumen de estas vainas se relacionaron con procesos de tensión superficial y disgregación de las capas más superficiales (Warsheid y Braams, 2000) (Fig. 2d).

Según Sand y Bock (1991), otra forma de biodeterioro de la piedra se debe a la acción de los ácidos orgánicos e inorgánicos producidos como subproducto del metabolismo microbiano, que pueden reaccionar con el calcio de la piedra para formar otros minerales. En las rocas carbonatadas, el ácido sulfúrico producido por bacterias del azufre puede formar yeso (sulfato de calcio dihidratado), mientras que el ácido oxálico, producido por muchos hongos, líquenes y algunas bacterias, puede formar minerales de oxalato cálcico. En muestras de la Cueva de Nerja, se determinó la presencia de yeso en el sustrato, aunque este hecho no pudo ser relacionado con la presencia de bacterias del azufre. Aunque no pudieron ser constatados cambios en la composición del sustrato debido a la presencia de los biofilms, sí se observaron morfologías que podrían corresponder a procesos de disolución inducida por los organismos (Fig. 2e). En ambas cuevas, las zonas con disolución y precipitación de minerales y crecimiento de microorganismos mostraban que parte del material superficial de las paredes y espeleotemas iluminados se debía a la mezcla de la calcita con la materia orgánica producida por los microorganismos.

Finalmente, cabe destacar que los biofilms analizados constituyen, además, una fuente de materia orgánica disponible (macromoléculas, bacterias muertas, depósitos de polvo, etc.) que favorece el desarrollo de organismos heterótrofos tales como hongos o actinobacterias. Así, con frecuencia se observaron numerosas actinobacterias y otros organismos filamentosos heterótrofos, en especial, en las muestras que procedían de la Cueva del Tesoro (Figs. 2e, 2f).

Conclusiones

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que, en ambas cavidades, los microorganismos se organizan en comunidades estructurales complejas (biofilms) que les confiere, entre otros beneficios, mayor protección frente a condiciones ambientales desfavorables. En relación con la composición, la identificación de los organismos presentes, realizada mediante técnicas de microscopía y de análisis molecular ha mostrado una biodiversidad dominada por cianobacte-

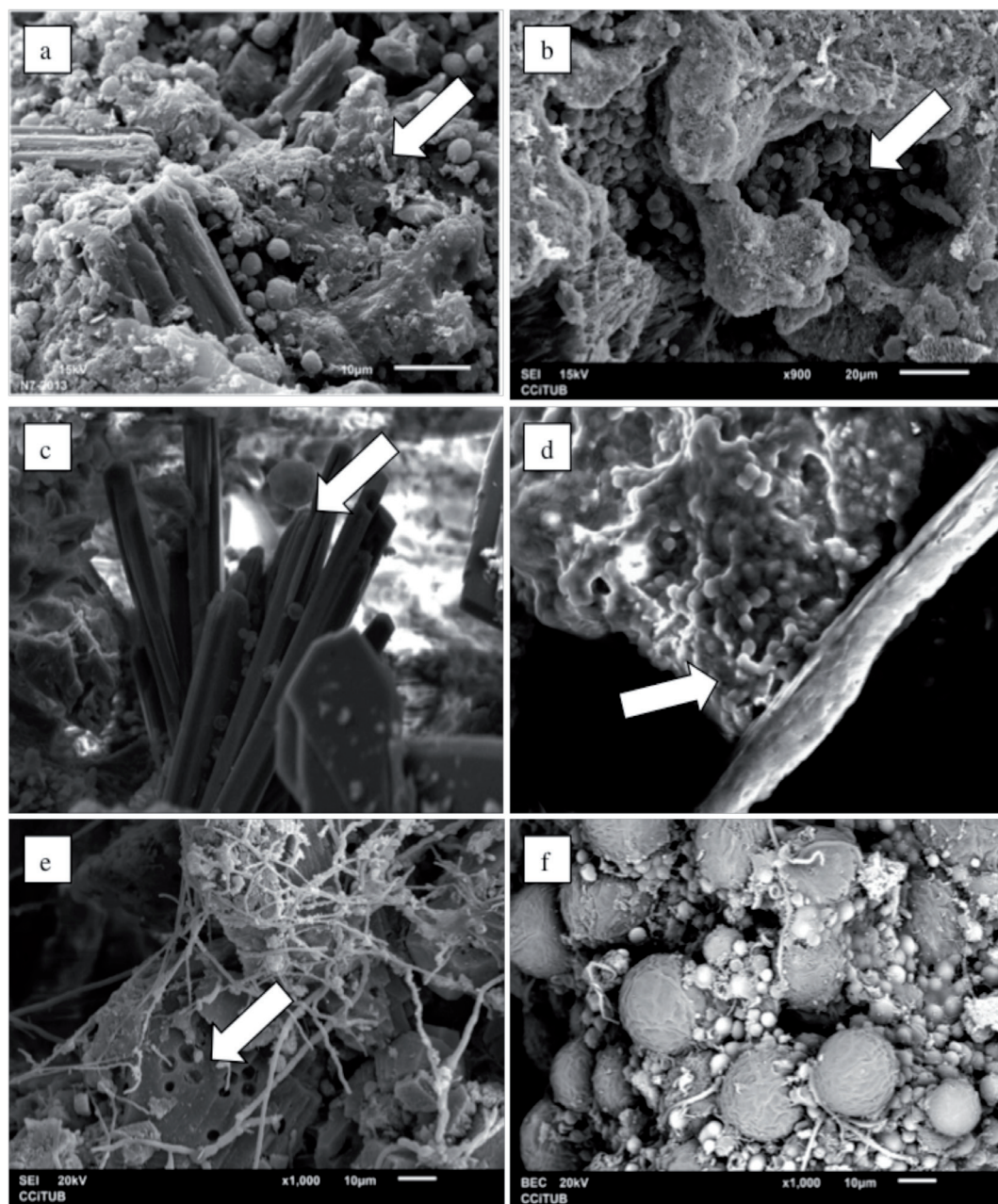


Figura 2. El microscopio electrónico de barrido reveló un sustrato calcítico con evidencias de biodeterioro: a) sustrato colonizado con superficie muy alterada, b) desarrollo de microorganismos casmoendolíticos en las oquedades del sustrato, c) organismos entre láminas de cristal del sustrato, d) biofilm con vaina de polisacáridos extracelulares que permite su adhesión al sustrato, e) sustrato colonizado por microorganismos y morfologías que podrían relacionarse con procesos de disolución, f) biofilm con compleja y diversa estructura de la comunidad microbiana

rias y microalgas, junto con actinobacterias, proteobacterias, arqueas, hongos e incluso protozoos y pequeños artrópodos, con biofilms más complejos y diversos en la Cueva del Tesoro, en los que destaca la abundancia de actinobacterias. En cambio, los biofilms de la Cueva de Nerja mostraron escasa biodiversidad que se relacionó con la presencia de un medio pobre en nutrientes. Así, los sustratos secos sólo permiten el desarrollo de dos taxones, adaptados a una sequía estacional y considerados extremófilos en la bibliografía, mientras que los más húmedos mostraron una mayor biodiversidad, también relacionada con la presencia de sustratos arcillosos. Las técnicas de microscopía han permitido identificar diferentes procesos y morfologías relacionadas con el biodeterioro, ocasionado por alteraciones físicas y químicas de la capa más superficial del sustrato, tales como decoloración, pérdida de consistencia, disolución y precipitación de minerales, entre otras.

El desarrollo de los biofilms analizados deriva de actuaciones antrópicas en el interior de ambas cuevas, como es la instalación de un sistema de iluminación. Estas comunidades biológicas, además de alterar el sustrato, pueden desplazar la microbiota natural de la cueva y alterar su ecosistema. Por tanto, una adecuada gestión del medio subterráneo como recurso turístico debe contar con medidas preventivas y correctoras destinadas al control y conservación del patrimonio natural y cultural de la cueva, entre ellas, la protección de su microbiota autóctona.

Referencias

- Albertano, P. 2012. Cyanobacterial biofilms in monuments and caves. En: Whitton, B.A. (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II. Their Diversity in Space and Time*. Durham: Springer, 317-343.
- Albertano, P. y Urzì, C. 1999. Structural interactions among epilithic cyanobacteria and heterotrophic microorganisms in Roman hypogea. *Microbial Ecology*, 38, 244-252.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- Barton, H.A. y Northup, D.E. 2007. Geomicrobiology in cave environments: Past, current and future perspectives. *Journal of Cave and Karst Studies*, 69, 163-178.
- Bastian, F., Jurado, V., Novakova, A., Alabouvette, C. y Saiz-Jimenez, C. 2010. The microbiology of Lascaux Cave. *Microbiology*, 156, 644-652.
- Ciniglia, C., Yoon, H.S. Pollio, A. Pinto G. y Bhattacharya, D. 2004. Hidden biodiversity of the extremophilic Cyanidiales red algae. *Molecular Ecology*, 13, 1827-1838.
- Chelius, M.K. y Moore, J.C. 2004. Molecular phylogenetic analysis of Archaea and Bacteria in Wind Cave, South Dakota. *Geomicrobiology Journal*, 21, 123-134.
- Chelius, M.K., Beresford, G., Horton, H., Quirk, M., Selby, G., Simpson, R.T., Horrocks, R. y Moore, J.C. 2009. Impacts of alterations of organic inputs on the bacterial community within the sediments of Wind Cave, South Dakota, USA. *International Journal of Speleology*, 38, 1-10.
- Diez, B., Pedros-Alio, C., Marsh, T.L. y Massana, R. 2001. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2942-51.
- de Freitas, C.R. y Schmekel, A. 2006. Studies of condensation/evaporation processes in the Glowworm Cave, New Zealand. *International Journal of Speleology*, 35, 75-81.

- Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G. y Baile, M.J. 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal A- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5488-5491.
- Großkopf, R.F., Janssen, P.H. y Liesack, W. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence alignments. *Bioinformatics*, 20, 2317-2319.
- Guillitte, O. 1995. Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *Science of Total Environment*, 167, 215-220.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hauer, T., Mühlsteinová, R., Bohunická, M., Kaštovský, J. y Mareš, J. 2015. Diversity of cyanobacteria on rock surfaces. *Biodiversity and Conservation*, 24, 759-779.
- Hernández-Mariné, M. y Roldán, M. 2005. Adherence of hormogonia to substrata is mediated by polysaccharides produced by necridic cells. *Algological Studies*, 117, 239-249.
- Hoyos, M., Soler, V., Cañaveras, J.C., Sánchez, S., y Sanz, E. 1996. *Estudio de la delimitación de las áreas de protección de las cuevas del Tesoro-Higuerón-Rincón de la Victoria (Rincón de la Victoria, Málaga)*, Informe no publicado. MNCN-CSIC, Madrid.
- Hueck-van der Plas, E.H. 1965. The biodeterioration of materials as a part of hylobiology. *Material und Organismen*, 1, 5-34.
- Lamprinou, V., Danielidis, D.B., Economou-Amilli, A. y Pantazidou, A. 2012. Distribution survey of Cyanobacteria in three Greek caves of Peloponnese. *International Journal of Speleology*, 4, 267-272.
- Liñán, C., Andreo, B., Carrasco, F. y Vadillo, I. 1999. Hidrodinámica e hidroquímica de las aguas de goteo de la Cueva de Nerja. En: Andreo, B., Carrasco, F. y Durán, J.J. (Eds). *Contribución del estudio científico de las cavidades kársticas al conocimiento geológico*, 393-402.
- Liñán, C., del Rosal, Y. y Carrasco, F. 2014. Control de parámetros ambientales en el sector no habilitado de una cueva turística: la Cueva de Nerja (Málaga, España). En: Calaforra y Durán (Eds.). *Iberoamérica subterránea. Actas del I Congreso Iberoamericano y V Congreso español sobre cuevas turísticas*, ACTE, 229-238.
- Lefèvre, M. 1974. La "maladie verte" de Lascaux. *Studies in Conservation*, 19, 126-156.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.-H., Pommering-Röser, A., Koops, H.-P. y Wagner, M. 1998. Combined molecular and onventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3042-3051.
- Jurado, V., Laiz, L, Rodríguez-Nava, V., Boiron, P., Herrnosín, B., Sánchez- Moral, S. y Saiz-Jimenez, C. 2010a. Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves. *Intertational Journal of Speleology*, 39, 15-24
- Jurado, V., Porca, E. y Saiz-Jiménez, C. 2010b. Control de un brote fúngico en la Cueva de Castañar de Ibor. En: Durán, J.J. y Carrasco, F. (Eds.). *Cuevas: Patrimonio, Naturaleza, Cultura y Turismo*, Madrid, Asociación de Cuevas Turísticas Españolas, 611-620.
- Jurado, V., Novakova, A., Hernández Mariné, M. y Saiz-Jimenez, C. 2014. Cueva del Tesoro, Rincon de la Victoria, Málaga: A treasure of biodiversity. En: C. Saiz-Jimenez (Ed.). *The Conservation of Subterranean Cultural Heritage*, 207- 213.

- Macedo, M.F., Miller A.Z., Dionísio, A. y Saiz-Jimenez C. 2009. Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview. *Microbiology*, 155, 3476-3490.
- Northup, D.E. y Lavoie, K.H. 2001. Geomicrobiology of caves: A review. *Geomicrobiology Journal*, 18, 199-222.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. y Muyzer, G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3327-32.
- Potts, M. 2001. Desiccation tolerance: a simple process? *Trends in Microbiology*, 9, 553-559.
- Pouličková, A. y Hašler, P. 2007. Aerophytic diatoms from caves in central Moravia (Czech Republic). *Preslia*, 79, 185-204.
- Roldán, M., Clavero, E., Castel, S. y Hernández-Mariné, M. 2004. Biofilms fluorescence and image analysis in hypogean monuments research. *Algological Studies*, 111, 127-133.
- Roldán, M. y Hernández-Mariné, M. 2009. Exploring the secrets of the three-dimensional architecture of phototrophic biofilms in caves. *International Journal of Speleology*, 38, 41-53.
- del Rosal, Y., Roldán, M., Liñán, C., Garrido, A. y Hernández Mariné, M. 2012. Tecnologías de microscopía: una ventana al conocimiento del biodeterioro. En: Durán, J.J. y Robledo, P.A (Eds.). *Las cuevas turísticas como activos económicos: conservación e innovación*, Madrid, ACTE, 359-372.
- Sand, W. y Bock, E. 1991. Biodeterioration of mineral materials by microorganisms-biogenic sulfuric and nitric acid corrosion of concrete and natural stone. *Geomicrobiology Journal*, 9, 129-38.
- Sáiz-Jiménez, C. y Ariño, X. 1995. Colonización biológica y deterioro de morteros por organismos fototrofos. *Materiales de construcción*, 45 (240), 5-16.
- Saiz-Jimenez, C. 1999. Biogeochemistry of weathering processes in monuments. *Geomicrobiology Journal*, 16, 27-37.
- Saiz-Jimenez, C., Cuezva, S., Jurado, V., Fernandez-Cortes, A., Porca, E., Benavente, D., Cañaveras, J.C. y Sanchez-Moral, S. 2011. Paleolithic art in peril: Policy and science collide at Altamira Cave. *Science*, 334, 42-43.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F. 2009. Introducing mothur: Open Source, platform-independent, community supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 7537-41.
- Teske, A., Wawer, C., Muyzer, G., Ramsing, N.B. 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and DGGE of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1405-1415.
- Warsheid, T.H. y Braams, J. 2000. Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46, 343-368.